苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ混合物对棉铃虫幼虫神经细胞钠通道的影响

胡兆农[1]，杜育哲[2]，贺秉军[2]，刘安西[2]，吴文君[1,*]

（1. 西北农林科技大学农药研究所，陕西杨凌 712100；2. 南开大学生命科学学院，天津 300071）

摘要：杀虫植物苦皮藤 *Celastrus angulatus* 的主要活性成分苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ处理后昆虫的中毒症状分别表现为麻醉和兴奋，但苦皮藤素Ⅳ对苦皮藤素Ⅴ的毒杀效果具有增效作用，苦皮藤素Ⅴ对苦皮藤素Ⅳ的麻醉作用基本没有影响。应用全细胞膜片钳技术，就苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ不同比例（3∶1，1∶1，1∶3）混合物对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫离体培养神经细胞钠离子通道的影响进行了比较。结果表明：苦皮藤素Ⅳ和苦皮藤素Ⅴ的不同比例混合物对钠通道（TTX-S）电流作用与二者所占比例有关，苦皮藤素Ⅳ比例大，表现出苦皮藤素Ⅳ对通道的阻滞效应，钠电流被抑制；苦皮藤素Ⅴ比例大，则表现出对通道的激活，钠电流增大。另外，两者不同比例混合物对钠通道（TTX-S）电流的激活电压无明显影响，但对峰值电压影响显著，可使其向正电位方向移动 10～20 mV。这些结果说明苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ可能作用于一个相同的钠通道结合位点或别构偶联位点，二者对钠通道的作用是一种拮抗作用。

关键词：植物性杀虫剂；棉铃虫；苦皮藤素；钠通道；全细胞膜片钳；拮抗作用

中图分类号：S482.39 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2008)04-0379-05

Effects of the mixture of celangulin Ⅳ and Ⅴ from *Celastrus angulatus* Max. on sodium channels in nerve cells of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*)

HU Zhao-Nong[1], DU Yu-Zhe[2], HE Bing-Jun[2], LIU An-Xi[2], WU Wen-Jun[1,*] (1. Institute of Pesticide Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300070, China)

Abstract: Celangulin Ⅳ and Ⅴ from the root bark of *Celastrus angulatus* are the major active ingredients of the insecticidal plant which can result in reverse nerve poisoning symptoms, *i.e.*, narcosis and excitation, respectively. The insecticidal efficacy of celangulin Ⅴ can be synergied by celangulin Ⅳ, but celangulin Ⅴ has no synergistic effects on the narcotic efficacy of celangulin Ⅳ. By using patch-clamp technique, the interaction of celangulin Ⅳ and Ⅴ in different ratio (3∶1, 1∶1, 1∶3) mixtures on tetrodotosin (TTX)-sensitive inward sodium channel current (I_{Na}) in cultured nerve cell of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) was investigated. The results showed that the effects corresponded with the ratio of celangulin Ⅳ and Ⅴ in a mixture. When the ratio of celangulin Ⅳ in a mixture was high, voltage gated sodium channel (VGSC) was blocked and TTX-sensitive I_{Na} was decreased. When the ratio of celangulin Ⅴ in a mixture was high, VGSC was activated and TTX-sensitive I_{Na} was increased. Different ratio mixtures of celangulin Ⅳ and Ⅴ showed no effect on activated voltage, except the peak voltage shifted to positive potential 10 – 20 mV. The results suggest that celangulin Ⅳ and Ⅴ share a binding site of VGSC or they bind to separate sodium channel sites which interact altosterically with each other, and they might antagonistically compete each other to bind the site on VGSC.

基金项目：国家自然科学基金项目(30471157)；国家重点基础研究发展规划‘973’项目(2003CB114404)；西北农林科技大学青年学术骨干支持计划(2007)

作者简介：胡兆农，男，1970 年生，甘肃临夏人，博士，副教授，研究方向为天然产物农药和昆虫毒理学，E-mail：huzhaonong@nwsuaf.edu.cn

* **通讯作者** Author for correspondence，Tel.：029-7093987；E-mail：wuwenjun@nwsuaf.edu.cn

收稿日期 Received：2007-10-08；**接受日期** Accepted：2008-02-19

Key words: Botanical insecticides; *Helicoverpa armigera*; celangulin; voltage-gated sodium channel; whole-cell patch clamp; antagonism

从植物苦皮藤 *Celastrus angulatus* Max. 中分离的苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ是具有二氢沉香呋喃骨架的多元酯类高杀虫活性化合物(吴文君等,2005)。毒力测定表明苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ作用昆虫后二者的神经中毒症状相反,分别表现为麻醉和兴奋,但苦皮藤素Ⅳ对苦皮藤素Ⅴ的毒杀效果具有明显的增效作用,苦皮藤素Ⅴ对苦皮藤素Ⅳ的麻醉作用基本没有影响(胡兆农等,2004a)。杀虫机理研究表明,苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ均可作用于昆虫神经肌肉接点,阻断兴奋性传导(胡兆农等,2000,2004b),但二者混用对神经肌肉兴奋性接点电位(EJPs)的抑制表现拮抗作用(胡兆农等,2005)。此外,苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ对昆虫神经肌肉兴奋性自发电位的影响相反,苦皮藤素Ⅳ降低了自发电位的发放频率,而苦皮藤素Ⅴ可增加其发放频率,这表明苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ由于空间结构的差异可能对果蝇幼虫神经-肌肉接点突触前膜的膜电位影响不同。

进一步的研究表明,苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ均对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫电压门控钠通道的作用具有浓度依赖性,并显著影响钠通道的动力学特征(杜育哲等,2002;胡兆农等,2007)。因而推测苦皮藤素Ⅳ和苦皮藤素Ⅴ均有可能作用于细胞膜上的钠通道,并具有相同的作用位点,可改变钠通道的门控动力学,但由于这两个化合物空间结构上的差异,致使中毒昆虫表现不同症状(胡兆农等,2004b,2005,2007)。为了进一步阐明苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ二者相互作用的机制,本文就苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ的不同比例混合物对棉铃虫幼虫神经细胞钠通道的影响进行了测定,旨在进一步明确其作用机理,为植物杀虫剂苦皮藤素的科学合理开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 溶液与试剂

细胞外液(mmol/L):NaCl 100,KCl 4,$CaCl_2$ 2,$MgCl_2$ 2,Hepes 10,葡萄糖 10,氯化四乙胺(tetraethylammonium chloride,TEA-Cl)30,$CdCl_2$ 0.5,NaOH 调至 pH 6.8。电极内液(mmol/L):CsF 100,CsCl 40,$MgCl_2$ 3,EGTA 10,Hepes 5,CsOH 调至 pH 6.8。CsCl,EGTA 和 Hepes 为 Gibco 产品,CsF 和 CsOH 为 Sigma 产品,其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 神经细胞的分离与培养

同胡兆农等(2007)。

1.3 全细胞膜片钳记录

同胡兆农等(2007)。

1.4 苦皮藤素的配制及加药处理

苦皮藤素Ⅳ(1β,2β,6α-三乙酰氧基-8β,9α-二(β-呋喃甲酰氧基)-12-异丁酰氧基-4α-羟基-β-二氢沉香呋喃)纯度为92%、苦皮藤素Ⅴ(1β,2β-二乙酰氧基-12,8α-二异丁酰氧基-9β-苯甲酰氧基-4α,6α-二羟基-β-二氢沉香呋喃)纯度为95%,均由西北农林科技大学农药研究所提供。

将苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ先用丙酮配制成 0.1 mol/L 的母液,低温保存备用。实验前,用细胞外液稀释母液至 0.1 μmol/L,然后按照苦皮藤素Ⅳ:Ⅴ = 3:1,1:1 和 1:3 比例等体积混合待用。实验时,先将药液加入尖端直径为 30 μm 的电极中,在倒置显微镜下用微操纵器操纵加药电极加药,加药时施加压力使药喷出,镜下可见药液流过选定细胞。

2 结果和分析

建立全细胞记录模式,观察 5 min,待对照电流稳定后,用加药电极将配置的药液加入细胞外液中完全淹没细胞。棉铃虫幼虫离体培养中枢神经细胞表达河豚毒素敏感型钠离子通道(TTX-S),无药剂作用时,钠电流在 −40 mV 左右激活,−30 ~ −20 mV 达峰值。

图1为苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ及3:1,1:1,1:3 比例混合物作用后 I_{Na} 的电流-电压(I-V)关系曲线。图2为苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ及 3:1,1:1,1:3 比例混合物的 I_{Na} 峰值变化率曲线。图3为苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ及3:1,1:1,1:3比例混合物对激活电压和峰值电压影响的结果。

从图1可见,苦皮藤素Ⅳ比例较高(苦皮藤素Ⅳ:Ⅴ = 3:1,1:1)时,钠电流初始阶段变化不明显,不像单用苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ显著地降低或是增加钠电流,只是 5 min 以后,才使钠电流缓慢减小;苦皮藤素Ⅴ比例高(苦皮藤素Ⅳ:Ⅴ = 1:3)时,可明显激活钠通道,使钠电流增大,而且此状态能够维持较长时间,直到 20 min 以后,才降低到加药前钠电流水平之下,这与单用苦皮藤素Ⅴ的状态相似。

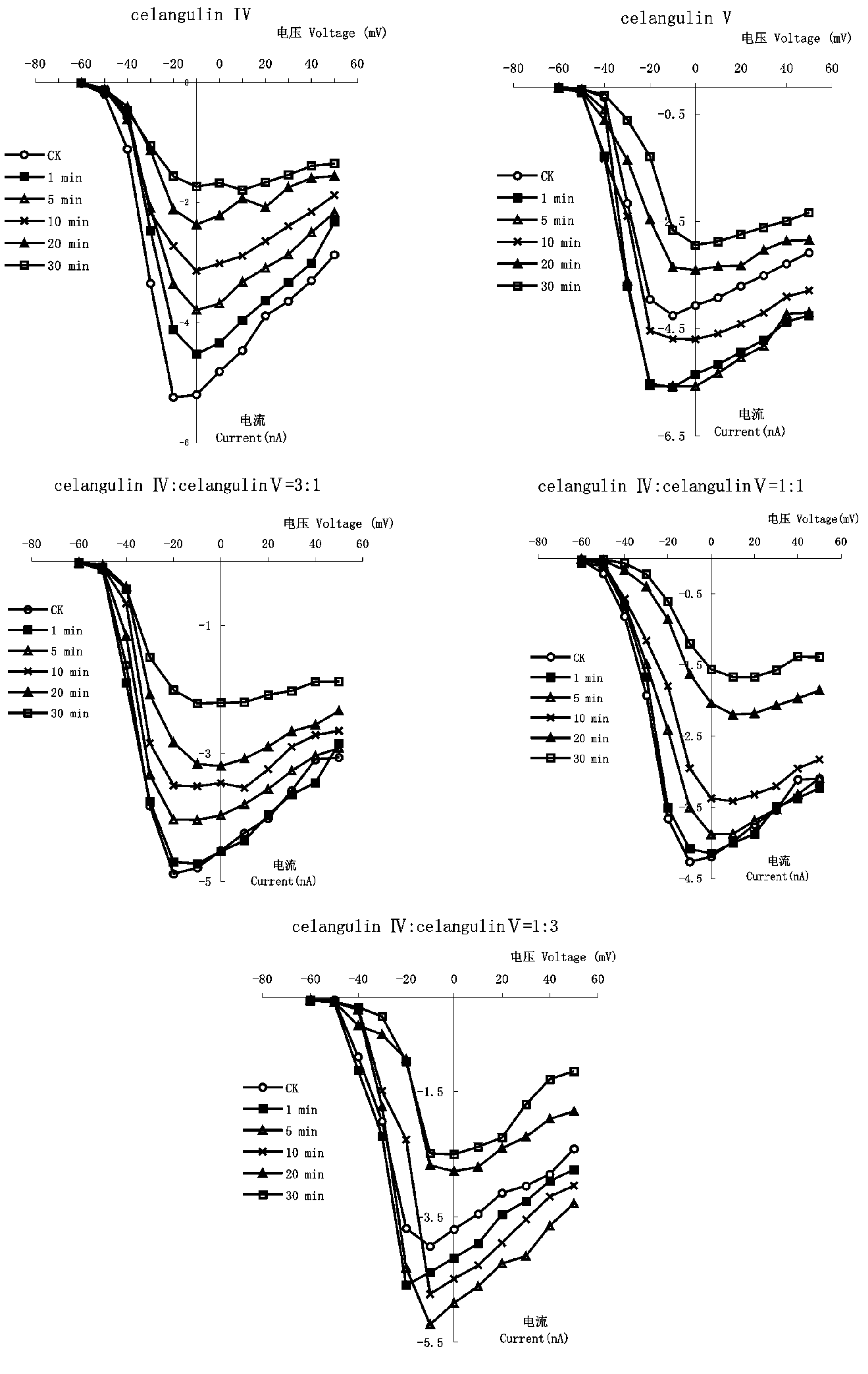

图 1　苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ不同比例混合物对 I_{Na} 电流-电压(I－V)的影响

Fig. 1　I-V curve of I_{Na} after treatment with the mixture of celangulin Ⅳ and Ⅴ

从图 2 可知，不加药对照（$n = 5$）在 30 min 内峰值电流比较稳定，变化率小于 5%。统计分析（$P < 0.05$）表明，0.1 μmol/L 苦皮藤素Ⅳ（$n = 7$）对 TTX-S 钠通道峰电流峰值有明显抑制作用，处理后峰值电流与加药前相比，1 min 时峰值电流减小 16.31% ± 6.53%，随着时间的延长，缓慢降低，至 30 min 时可减小 61.73% ± 6.54%。而 0.1 μmol/L 苦皮藤素Ⅴ（$n = 6$）处理后 10 min 内峰值电流与加药前相比显著增大，增加幅度最大为 37.03% ± 7.74%。随后降低，15 min 时峰值电流降至与加药前相当。之后，峰

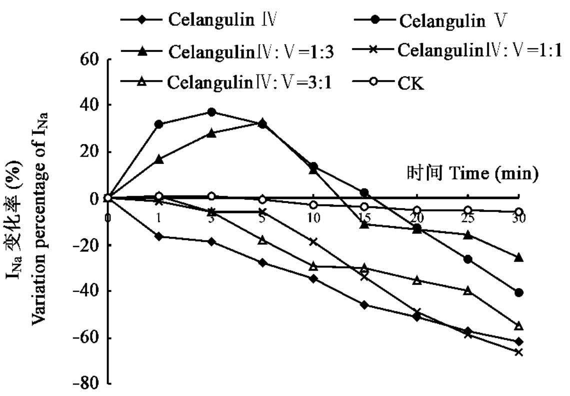

图 2 苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ不同比例混合物的 I_{Na} 峰值变化率曲线

Fig. 2 Variation curve of I_{Na} peak *vs* time after treatment with the mixture of celangulin Ⅳ and Ⅴ

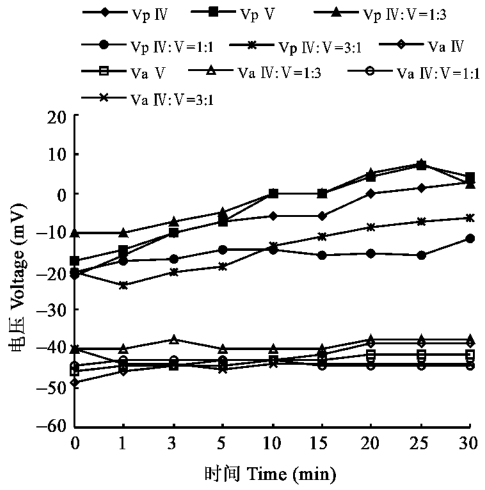

图 3 苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ不同比例混合物对激活电压和峰值电压的影响

Fig. 3 Changes of active potential (Va) and peak potential (Vp) of I_{Na} *vs* time after treatment with the mixture of celangulin Ⅳ and Ⅴ

值电流比加药前相比逐渐减小，至 30 min，降低 40.75% ± 3.28%。苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ比例为 3∶1 的处理（$n = 4$）峰值电流的变化趋势与单用苦皮藤素Ⅳ相似，仅是峰值电流下降较后者缓慢，3 min 时峰值电流仅减小 6.07% ± 4.10%，30 min 时减小 54.89% ± 3.85%。苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ比例为 1∶1 的处理（$n = 7$）1 min 峰值电流变化不明显，随时间延长，与加药前相比缓慢降低，至 30 min 时峰值电流减小 40.23% ± 9.14%。苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ的 1∶3 比例处理（$n = 4$）峰值电流的变化趋势与单用苦皮藤素Ⅴ类似，1 min 时峰值电流增大 16.98% ± 3.55%，5 min 时增加幅度最大，达到 32.73% ± 6.62%，然后降低，10 ~ 15 min 时峰值电流与加药前相当，随后减至加药前水平，至 30 min 时较加药前减小 25.36% ± 6.55%。以上分析，进一步表明苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ不同比例混合对钠通道的作用与苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ各自在混合物中所占比例有关，效应具有显著的浓度和时间依赖性。

根据图 1 和图 3 也可以看出，与苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ单用相似，不同比例混合物对钠通道电流的激活电压无明显影响，但对峰值电压影响显著，随着时间延长，引起对峰值电压向正电位方向移动 10 ~ 20 mV。表明苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ混合物也使峰值电流向高电压激活的钠通道电流转变。

3 讨论

本文结果表明，钠通道电流的变化与混合物中苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ各自含量的变化直接相关，随着苦皮藤素Ⅳ含量的增加，相同时间内峰值电流的降低加快，而随着苦皮藤素Ⅴ含量的增加，电流先是增加然后再缓慢降低；而且这些效应也具有明显的时间依赖性。这也进一步证实，苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ对电压门控钠通道电流的影响具有显著的浓度和时间依赖性（胡兆农等，2007）。

在拟除虫菊酯类对钠通道作用的研究中，发现引起钠通道本质上不同动力学修饰的菊酯类在共享的一个结合位点或别构偶联的位点上可完全发挥其作用，因此，一个位点的占领就排除了第二个的占领（Soderlund *et al*., 2002）。就菊酯类杀虫剂对钠电流和钠通道的联合作用而言，两种不同类型菊酯的联合作用是一种拮抗而不是相加或增效（Motomura and Narahashi, 2001）。苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ各自对钠通道的影响类同于不同类型拟除虫菊酯类杀虫剂对钠通道动力学的修饰（胡兆农等，2007），钠通道可能是苦皮藤素类化合物作用神经系统的一个靶标。从苦皮藤素Ⅳ和苦皮藤素Ⅴ以不同比例混用对钠通道的影响来看，其对钠通道的作用与二者所占比例有关，苦皮藤素Ⅳ比例大，表现出苦皮藤素Ⅳ对通道的阻滞效应，钠电流被抑制；苦皮藤素Ⅴ比例大，则表现出对通道的激活，钠电流增大。这些结果表明，二者对钠通道的结合可能存在一种竞争，苦皮藤素Ⅳ和苦皮藤素Ⅴ也可能存在一个共享的结合位点或别构偶联位点；苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ对钠电流和钠通道的作用是一种拮抗作用，而不是相加或增效作用。因此，结合生物测定的结果，可以认为苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ对神经系统的作用是相互拮抗的，没有增效作用。生测中表现出某一比例具有增效作用（胡兆农等，

2004a)，仅是由于两个化合物在穿透或是空间上的隔离所致(刘慧霞等，2002)。

另外，已经发现两类作用电压门控钠通道的蝎毒素，一类是可致使昆虫产生挛缩性麻痹(contraction paralysis)的兴奋性毒素，另一类则是可致中毒昆虫产生软瘫性麻痹(flaccid paralysis)的抑制性毒素(Zlotkin *et al*.，1985)。研究证实，兴奋性毒素可诱发轴突的重复发放，这有助于峰值钠电流的增加和失活的减慢，而抑制性毒素可使轴突膜去极化加强和强烈抑制钠电流从而引起动作电位的阻断。结合试验还表明抑制性毒素可抑制兴奋性毒素的结合，兴奋性毒素仅是在抑制性毒素的高亲和结合位点上与抑制性毒素竞争(Cestèle and Catterall，2000)。就苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ而言，引起的中毒症状相反，分别表现为麻醉和兴奋，类似于这两类蝎类毒素。而对 EJPs 和钠通道作用的研究也表明，苦皮藤素Ⅳ可竞争性抑制苦皮藤素Ⅴ的影响，因此可推测苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ也可能类似这两类蝎类毒素的作用，在钠通道上存在一个共同的作用位点。而这一点也可用以进一步解释苦皮藤素制剂在田间表现麻醉症状的原因，即除了苦皮藤素Ⅳ的毒力比苦皮藤素Ⅴ高和作用速度快以外(胡兆农等，2004a)，可能最重要的原因就是苦皮藤素Ⅳ(麻醉症状)作用电压门控钠通道时抑制了苦皮藤素Ⅴ(兴奋症状)的作用。

参 考 文 献 (References)

Cestèle S, Catterall WA, 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*, 82：883－892.

Du YZ, He BJ, Wang W, Liu AX, Hu ZN, Wu WJ, 2002. Patch clamp study on the anesthetics mechanisms of celangulin Ⅳ. *Acta Biophysica Sinica*, 18(3)：297－301. [杜育哲，贺秉军，王葳，刘安西，胡兆农，吴文君，2002. 苦皮藤素Ⅳ麻醉机理的膜片钳研究. 生物物理学报，18(3)：297－301]

He BJ, Liu AX, Chen JT, Sun JS, Rui CH, Meng XQ, 2001. Acute isolation and culture of nerve cell from cotton bollworm and patch clamp study on voltage-gated ion channels in the cultured neurons. *Acta Entomologica Sinica*, 44(4)：422－427. [贺秉军，刘安西，陈家童，孙金生，芮昌辉，孟香清，2001. 棉铃虫幼虫神经细胞的急性分离培养及其电压门控通道的膜片钳研究. 昆虫学报，44(4)：422－427]

Hu ZN, Wu WJ, Gao YC, Liu AX, 2000. Narcosis action electrophysiology of celangulin Ⅳ from *Celastrus angulatus*. *Acta Univ. Agri. Boreail-Occidentails*, 28(2)：35－38. [胡兆农，吴文君，高永闯，刘安西，2000. 苦皮藤Ⅳ杀虫机理电生理研究初报. 西北农业大学学报，28(2)：35－38]

Hu ZN, Ji ZhQ, Qi ZhJ, Shi BJ, Wu WJ, 2004a. Toxicity interaction of celangulin Ⅳ and Ⅴ from *Celastrus angulatus* against armyworm (*Mythimna separata*) larvae. *J. Northwest Sci-Tech Univ. Agri. For.* (*Nat. Sci. Ed.*), 32(5)：27－30. 胡兆农，姬志勤，祁志军，师宝君，吴文君，2004a. 植物杀虫剂苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ混用研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，32(5)：27－30]

Hu ZN, Wu WJ, Ji ZQ, Li AX, 2004b. Effects of celangulin Ⅳ and Ⅴ from *Celastrus angulatus* on excitatory junction potentials of *Drosophila melanogaster* larvae. *J. Northwest Sci-Tech Univ. Agri. For.* (*Nat. Sci. Ed.*), 32(6)：60－63. [胡兆农，吴文君，姬志勤，刘安西，2004b. 苦皮藤素对果蝇幼虫神经肌肉兴奋性接点电位的影响. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，32(6)：60－63]

Hu ZN, Wu WJ, He BJ, Liu AX, 2005. Effects of the mixture of celangulin Ⅳ and Ⅴ from *Celastrus angulatus* Max. on excitatory junction potentials of *Drosophila melanogaster* larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 48(6)：876－880. [胡兆农，吴文君，贺秉军，刘安西，2005. 苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ混合物对果蝇幼虫神经肌肉兴奋性接点电位的影响. 昆虫学报，48(6)：876－880)

Hu ZN, He BJ, Du YZ, Liu AX, Wu WJ, 2007. Effects of celangulin Ⅳ and Ⅴ on sodium channels in nerve cells of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Acta Entomologica Sinica*, 2007, 44(8)：788－794 [胡兆农，贺秉军，杜育哲，刘安西，吴文君，2007. 苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ对棉铃虫幼虫神经细胞钠通道的影响. 昆虫学报，50(8)：788－794]

Liu HX, Yang CJ, Wu H, Wu WJ, Lian XH, 2002. Further studies on the mechanism of selective toxicity of celangulin Ⅴ. *J. Northwest Sci-Tech. Univ. Agri. For.* (*Nat. Sci. Ed.*), 30(2)：83－86. [刘惠霞，杨从军，吴昊，吴文君，廉喜红，2002. 苦皮藤素Ⅴ对昆虫选择毒性机理的进一步研究西北农林科技大学学报(自然科学版)，30(2)：83－86]

Motomura H, Narahashi T, 2001. Interaction of tetramethrin and deltamethrin at the single sodium channel in rat hippocampal neurons. *Neurotoxicology*, 22：329－339.

Soderlund DM, Clark JM, Sheets LP, Mullin LS, Piccirillo ⅤJ, Sargent D, Stevens JT, Weiner ML, 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity：implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 171：3－59.

Wu WJ, Hu ZN, Liu HX, Qi ZJ, 2005. Insecticidal mechanisms of the major active components from the Chinese bittersweet, *Celastrus angulatus*, and their application. *Acta Entomologica Sinica*, 48(5)：770－777. [吴文君，胡兆农，刘惠霞，祁志军，2005. 苦皮藤主要杀虫有效成分的杀虫作用机理及其应用. 昆虫学报，48(5)：770－777]

Yang RY, Liu HX, Wu WJ, Wang JL, 2001. Study on the functioning mechanism of celangulin Ⅴ. *J. Northwest Sci-Tech Univ. Agri. For.* (*Nat. Sci. Ed.*), 29(1)：77－79. [杨润亚，刘惠霞，吴文君，王金丽，2001. 苦皮藤素Ⅴ引起粘虫失水的作用机理初探. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，29(1)：77－79]

Zlotkin E, Kadouri D, Gordon D, Pelhate M, Martin M F, Rochat H, 1985. An excitatory and a depressant insect toxin from scorpion venom both affect sodium conductance and possess a common binding site. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 240：877－887.

(责任编辑：黄玲巧)